

На правах рукописи

ИВОНИН АЛЕКСЕЙ ГЕННАДЬЕВИЧ

**ОЦЕНКА АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV
НИИЭГ НА МОДЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань 2010

Работа выполнена на кафедре морфологии и микробиологии ФГОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия»

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор
Романов Владимир Евдокимович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Погорельский Иван Петрович

кандидат биологических наук, доцент
Вершинина Валентина Ивановна

Ведущая организация: ФГУ «48 Центральный научно-
исследовательский институт Министерства
Обороны РФ», г. Киров

Защита диссертации состоится «29» апреля 2010 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского при Казанском государственном университете.

Автореферат разослан « » апреля 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Чума является зооантропонозным инфекционным заболеванием бактериальной природы, характеризующимся контагиозностью, тяжелым течением и высокой летальностью (Смирнова, Кутырев, 2006; Трухачев, Лебедев, 2006). Став в прошлом причиной гибели миллионов людей, упадка государств и цивилизаций, чума и на сегодняшний день сохраняет высокий эпидемический потенциал (Анисимов, 2002; Кутырев, 2008). Реальную угрозу появления вспышек болезни в современном мире создает активизация природных и антропургических очагов чумы, занимающих значительные территории, усиление миграционных процессов, а также возможность использования возбудителя (*Yersinia pestis*) биотеррористами (Lippi, Conti, 2002; Riedel, 2005; Попов с соавт., 2007).

В последние годы достигнуты значительные успехи в исследовании физиологических и биохимических особенностей чумного микроба, обуславливающих его патогенность. Достаточно полно охарактеризованы факторы агрессии *Y. pestis*, подавляющие защитные реакции хозяина и обеспечивающие выживание популяции в условиях макроорганизма (Viboud, Bliska, 2005; Knirel et al., 2006; Афанасьева с соавт., 2008). В то же время слабо освещенными остаются вопросы, касающиеся адгезивной способности чумных бактерий в отношении эукариотических клеток (Huang, Lindler, 2004; Liu et al., 2006).

По современным представлениям, адгезия возбудителя играет ключевую роль в развитии любого инфекционного процесса, во многом определяя его начало, характер и течение (Boyle, Finlay, 2003; Labbate et al., 2007). В микробной клетке функцию распознавания и связывания с клетками-мишенями выполняют поверхностные субстанции, так называемые адгезины, которые могут быть представлены белками наружной мембраны, а также специализированными органеллами – пиями (Сидоренко, 2001; Мавзютов с соавт., 2007). Структуры, подобные пиям ряда прокариот, выявлены и у чумных бактерий (Lindler, Tall, 1993). Установлено, что клетки *Y. pestis* обладают способностью прикрепляться к искусственным поверхностям (Дятлов с соавт., 1991) и культивируемым эпителиальным клеткам дыхательного тракта человека (Thomas, Brooks, 2004; Бахтеева, 2008). Однако эти сведения не позволяют оценивать адгезивный потенциал возбудителя чумы в полной мере.

Анализ литературы (Поспелова с соавт., 1998; Телесманич с соавт., 2004; Зайцева, Сомов, 2006) свидетельствует о том, что универсальной моделью для исследования адгезии бактерий являются эритроциты, что связано с присутствием на их поверхности гликофорина, идентичного гликокаликсу эпителиоцитов, на котором расположены рецепторы для микроорганизмов. Исходя из этого, изучение возможности применения эритроцитов при оценке адгезивных свойств чумного микроба является весьма актуальным. Кроме того, учитывая присутствие патогена в кровеносном русле на стадии бактериемии (Perry, Fetherson, 1997; Анисимов, 2002), определение характера

взаимодействия *Y. pestis* с эритроцитами как самыми многочисленными форменными элементами крови представляет самостоятельный интерес.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось определение адгезивных свойств штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в тесте *in vitro* с использованием эритроцитов в качестве клеток-мишеней.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить возможность оценки адгезивной активности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ на модели эритроцитов человека традиционными методами.

2. Разработать метод оценки связывания клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека при помощи фотокolorиметрии.

3. Определить влияние условий выращивания бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ и физиологического состояния микробных клеток на их адгезивные свойства.

4. Оценить адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам людей с различными группами крови по системам АВ0 и Rh, а также к эритроцитам разных видов лабораторных, домашних и сельскохозяйственных животных.

5. Исследовать влияние антибиотиков, а также плазмы и сыворотки крови на проявление клетками *Y. pestis* EV НИИЭГ адгезивной активности в отношении эритроцитов человека.

Научная новизна. Впервые для оценки адгезивного потенциала чумного микроба на модели эритроцитов предложен фотокolorиметрический метод (патент РФ на изобретение №2360969 «Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов» от 06.11.2007 г.).

Впервые осуществлена комплексная оценка влияния режима культивирования и физиологического состояния клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ на их способность прикрепляться к эритроцитам. Проведено сопоставление адгезивных, гидрофобных и гемагглютинирующих свойств культур чумного микроба, выращенных в различных условиях.

Выявлено, что уровень адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека не зависит от группы крови донора по системам АВ0 и Rh, но в то же время зависит от индивидуальных особенностей эритроцитов. Впервые установлены существенные различия в способности чумного микроба прикрепляться к эритроцитам разных видов млекопитающих.

Показано отсутствие влияния терапевтических и субтерапевтических концентраций антибиотиков (гентамицина, доксициклина, цефотаксима и ампициллина) на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека. В то же время обнаружено, что плазма и сыворотка крови человека, а также их отдельные белковые компоненты обладают выраженными антиадгезивными свойствами в отношении чумных бактерий.

Практическая значимость работы.

Полученные в работе результаты вносят значительный вклад в раскрытие феномена адгезивной активности чумного микроба, и как следствие, способствуют пониманию основ его патогенности.

Предложен информативный и доступный для практического применения метод определения адгезивной способности бактерий *Y. pestis* на модели эритроцитов при помощи фотоколориметрии. Метод может быть использован для изучения механизмов, участвующих в прикреплении патогена к клеткам хозяина, и поиска соединений, способных блокировать данный процесс. Кроме того, разработанный фотоколориметрический метод может найти применение при оценке адгезивных свойств других микроорганизмов бактериальной природы.

Декларация личного участия автора. Экспериментальные исследования выполнялись лично автором или при его непосредственном участии в составе научной группы, возглавляемой к.м.н., доцентом В.А. Обориным. Обработка полученных данных, их интерпретация и оформление осуществлены автором самостоятельно.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный фотоколориметрический метод регистрации прикрепления бактерий *Y. pestis* к эритроцитам в условиях *in vitro* позволяет оценивать адгезивные свойства чумного микроба.

2. Экспрессия бактериями *Y. pestis* EV НИИЭГ факторов адгезии в значительной степени зависит от состава питательной среды и температуры выращивания микробной культуры. Оптимальная по составу питательная среда обеспечивает стабильность адгезивной активности микробных клеток как в ходе пассажей *in vitro*, так и после лиофильного высушивания.

3. Внутривидовые и межвидовые различия в устойчивости эритроцитов к прикреплению бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ свидетельствуют о роли рецепторных структур клеток-мишеней в реализации чумным микробом адгезивной способности.

4. Сыворотка (плазма) крови человека, а также её отдельные компоненты препятствуют проявлению клетками *Y. pestis* EV НИИЭГ адгезивных свойств в отношении эритроцитов.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на научно-практической конференции и школе по инфекционной патологии (с международным участием) (Москва, 2007), международной конференции «Международное сотрудничество и развитие биотехнологии в Кировской области» (Киров, 2008), 8-й научной конференции аспирантов и соискателей «Науке нового века – знания молодых» (Киров 2008), Всероссийской научно-практической конференции «Достижения ветеринарной науки и практики» (Киров, 2008), Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора П.Г. Петского «Современные научные тенденции в животноводстве» (Киров, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н., профессору В.Е. Романову, к.м.н., доценту В.А. Оборину за формирование научной концепции работы и методические консультации при её выполнении, а также аспирантам кафедры микробиологии ГОУ ВПО «ВятГУ» О.В. Вылегжаниной и Ф.И. Лянгасовой за помощь при проведении экспериментальных исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов исследований, обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 221 источник, в том числе 112 зарубежных. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, иллюстрирована 27 рисунками и 12 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основным объектом исследований являлся штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, выделенный из чумной живой сухой вакцины (ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», г. Киров). Также в работе использовали штамм *Escherichia coli* М-17, выделенный из пробиотического препарата «Колибактерин» (ОАО «Микроген, г. Москва), штамм *Bifidobacterium bifidum* №1, выделенный из пробиотика «Бифидумбактерин» (ОАО «Микроген», г. Москва), производственный штамм *Lactobacillus plantarum* Р4, полученный в ОАО «Агровет» (г. Москва), клинические штаммы *Escherichia coli* серогрупп О86, О112, О124, О142, О144 и О152, полученные из бактериологической лаборатории госпиталя в/ч 1407, а также музейные штаммы *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Serratia marcescens* и *Klebsiella pneumoniae* из коллекции кафедры морфологии и микробиологии ФГОУ ВПО Вятская ГСХА.

Для выращивания клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ применяли плотную питательную среду на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар) (рН 7,2), мясо-пептонный агар (МПА) (рН 7,2) и агар Хоттингера (АХ) (рН 7,2). В ряде экспериментов в питательные среды вносили дополнительные ингредиенты: сульфит натрия (1:30000) и генцианвиолет (ГВ) (1:100000). Микробную культуру выращивали при температуре (28±1)°С в течение 48 часов. Клинические и музейные штаммы культивировали на ГРМ-агаре (рН 7,2) при температуре (37±1)°С в течение 24 часов. Пробиотические штаммы (лиофилизированные культуры) использовали в работе без предварительного подращивания на питательной среде.

Материалом для получения эритроцитов служила венозная кровь клинически здоровых людей и животных. Пробы крови людей получали из ФГЛУ «Кировская областная станция переливания крови», пробы крови животных – из вивария ФГОУ ВПО Вятская ГСХА (белые мыши), питомника ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ» (белые крысы, морские свинки, золотистые хомячки), ФГУ «Кировская областная станция по борьбе с болезнями животных» (собаки, кошки), ветеринарной клиники и лаборатории коневодства

ФГОУ ВПО Вятская ГСХА (коровы, лошади), ОАО «Кировский мясокомбинат» (свиньи), хозяйств частного сектора Кировской области (бараны). В качестве антикоагулянтов использовали 3,8% раствор натрия цитрата (1:10) или гепарин (3,0 ЕД/мл крови). Не позднее 24 часов после взятия крови эритроциты трижды отмывали десятикратным объемом стерильного 0,9% раствора хлорида натрия (pH 7,2) путём центрифугирования при 300 g в течение 10 мин, после чего суспендировали в этом же растворе.

Танизированные эритроциты готовили по методике, описанной Бондаренко с соавторами (Бондаренко с соавт., 1987), формализированные эритроциты - по методике Колгановой (Колганова, 2003).

Для получения нативной человеческой сыворотки кровь от донора брали в стерильную пробирку без антикоагулянта. Пробирку с кровью выдерживали в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 часа, а затем помещали в холодильник с температурой $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ на 24 часа. По истечении этого срока сгусток свернувшейся крови удаляли и центрифугировали первичную сыворотку при 300 g в течение 10 мин. Отобранную надосадочную жидкость (вторичную сыворотку) использовали в работе. Для получения человеческой плазмы гепаринизированную кровь, взятую в пробирку, центрифугировали при 300 g в течение 10 мин, после чего отбирали жидкость над осадком.

Адгезивную способность бактерий определяли при помощи методов Брилис с соавторами (Брилис с соавт., 1986) и Гизатулиной с соавторами (Гизатулина с соавт., 1991).

При оценке адгезии методом Брилис использовали суспензию бактерий в концентрации $1,0 \times 10^9/\text{мл}$ в 0,9% растворе хлорида натрия (pH 7,2) и суспензию эритроцитов человека 0(I) Rh+ группы крови в концентрации $1,0 \times 10^8/\text{мл}$. В пробирках смешивали по 0,5 мл суспензий микробных клеток и эритроцитов. Смесь инкубировали на встряхивателе при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. После на предметных стеклах готовили мазки, которые фиксировали смесью Никифорова, окрашивали по Граму и исследовали в иммерсионной системе микроскопа. Адгезивные свойства оценивали по индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ) – среднему количеству бактерий на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците.

При использовании метода Гизатулиной на изолированные микробные колонии, выращенные на плотной питательной среде в чашках Петри, наносили суспензию эритроцитов человека 0(I) Rh+ группы крови в концентрации $0,5 \times 10^8/\text{мл}$. Через 3 мин чашки просматривали под малым увеличением микроскопа и подсчитывали колонии микроорганизмов, вокруг которых образовывался ореол из эритроцитов. Такие колонии считали адгезивно-активными, их количество выражали в процентах.

Гидрофобность бактерий определяли по степени их адсорбции на поверхности каплей хлороформа (Серебрякова с соавт., 2002).

Определение гемагглютинирующей активности бактерий проводили по методике, изложенной Ломовым с соавторами (Ломов с соавт., 2007).

Для трипсинизации бактерий применяли метод, описанный Грабовской и Тотоляном (Грабовская, Тотолян, 1977).

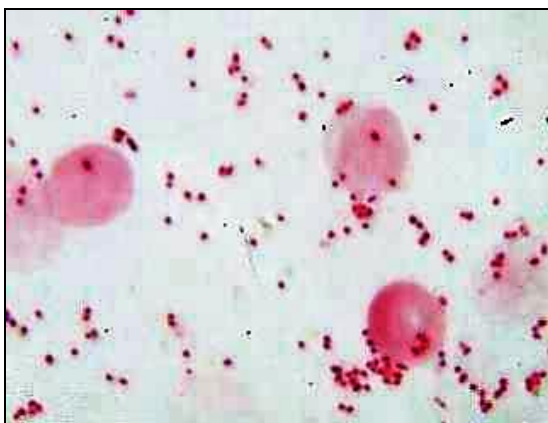
Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью пакета программ «Excel 2003» и программы «Biostat» версии 4.03., вычисляя значение средней величины (М) и стандартную ошибку средней (m). Достоверность различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Исследование взаимосвязи между отдельными показателями проводили с применением корреляционного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка адгезивных свойств штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ на модели эритроцитов традиционными методами

На первом этапе исследований нами было проведено определение адгезивной активности бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ методами Брилис и Гизатулиной. Согласно результатам оценки адгезии методом микробные клетки обладали выраженной способностью связываться с эритроцитами человека (ИАМ составлял $7,4 \pm 1,3$). В то же время при использовании методики Гизатулиной колоний чумного микроба, обладающих адгезивной активностью, мы не выявили. Результаты определения адгезивных свойств клинических и музейных штаммов микроорганизмов подтверждали отсутствие сопоставимости между показателями, полученными при помощи данных методов.

Тем не менее, метод Брилис давал возможность оценивать микроскопическую картину прикрепления бактерий к эритроцитам (рис. 1 А), тогда как метод Гизатулиной позволял наблюдать лишь взаимодействие эритроцитов с микробными колониями, выращенными на плотной питательной среде (рис. 1 Б).



А



Б

Рисунок 1. (А) – Взаимодействие бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека (увеличение $\times 1000$); (Б) – Взаимодействие эритроцитов человека с колонией *Y. pestis* EV НИИЭГ (увеличение $\times 80$)

Поэтому учитывали результаты, полученные только методом Брилис, согласно которым штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ характеризовался высокой

адгезивностью, превышающей аналогичную способность прочих исследованных штаммов в 2,0-4,8 раза. Однако и данный метод обладал существенными недостатками, к которым относилась трудоемкость подсчета адгезированных бактерий, а также сложность интерпретации картины адгезии в связи с невозможностью дифференцировать микробные клетки, прикрепившиеся к эритроцитам и расположенные на их фоне. Это свидетельствовало о необходимости разработки нового подхода для выявления адгезивных свойств бактерий в тесте с эритроцитами.

2. Разработка фотоколориметрического метода оценки адгезивных свойств штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ на модели эритроцитов человека

Для определения адгезивной способности клеток чумного микроба нами был предложен метод, базирующийся на фотоколориметрической оценке степени связывания бактерий с эритроцитами после их совместной инкубации и последующей седиментации эритроцитов путем центрифугирования.

При выявлении возможности регистрации адгезии предложенным методом использовали культуру *Y. pestis* EV НИИЭГ I генерации, выращенную на ГРМ-агаре с ГВ. В качестве сравнения применяли музейный штамм *S. epidermidis* (неадгезивный микроорганизм). Микробные клетки суспендировали в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (рН 7,2). Конечная концентрация бактерий в суспензии соответствовала 1,0 единице оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540 нм и длине оптического пути кюветы 5 мм. Для соблюдения стандартных условий на данном этапе экспериментов применяли эритроциты только одного донора 0(I) Rh+ группы крови.

В пробирки вносили по 2,5 мл суспензии микробных клеток и 1,0 мл суспензии эритроцитов в концентрации $0,1 \times 10^9$ /мл. Контролем служили пробы, содержащие; 2,5 мл суспензии микробных клеток и 1,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия (рН 7,2) (контрольная проба №1); 1,0 мл суспензии эритроцитов и 2,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия (рН 7,2) (контрольная проба №2). Опытные и контрольные пробы инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на вращающейся платформе в течение 30 мин, а затем центрифугировали при 80 g в течение 1,5 мин для осаждения эритроцитов. После этого из проб отбирали надосадочную жидкость в объёме 2,0 мл и измеряли её ОП.

Уровень адгезии рассчитывали по видоизмененной нами формуле определения гидрофобных свойств микробных клеток:

$$\text{ПА} = (D_{\text{к1}} + D_{\text{к2}} - D_{\text{оп}}) / D_{\text{к1}} \times 100\%,$$

где ПА – показатель адгезии, $D_{\text{к1}}$ – ОП надосадочной жидкости в контрольной пробе №1, $D_{\text{к2}}$ – ОП надосадочной жидкости в контрольной пробе №2, $D_{\text{оп}}$ – ОП надосадочной жидкости в опытной пробе.

Для штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ величина ПА составила $26,5 \pm 3,6\%$, что свидетельствовало о прикреплении к эритроцитам соответствующего процента микробных клеток. Близкое к нулю значение ПА штамма *S. epidermidis* ($1,2 \pm 1,1\%$) указывало на отсутствие у него адгезивной активности. Микроскопические

исследования осадка из опытных проб после центрифугирования подтверждали результаты фотоколориметрической оценки адгезии.

В ходе экспериментов установили, что увеличение концентрации эритроцитов в реакционной смеси приводило к существенному повышению ПА культуры *Y. pestis* EV НИИЭГ и не влияло на регистрируемый уровень адгезии культуры *S. epidermidis* (рис. 2). Вместе с тем при использовании суспензии эритроцитов в концентрации $2,0 \times 10^9$ /мл величина ПА вакцинного штамма чумного микроба приближалась к 100%, что свидетельствовало о прикреплении к эритроцитам практически всех бактерий, находящихся в суспензии. Для проведения дальнейших исследований выбрали концентрацию эритроцитов $1,0 \times 10^9$ /мл. При этом ПА клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ был достаточно высоким – на уровне 80%, но в то же время в пробах оставались бактерии, не связанные с эритроцитами (около 20% от общего количества).

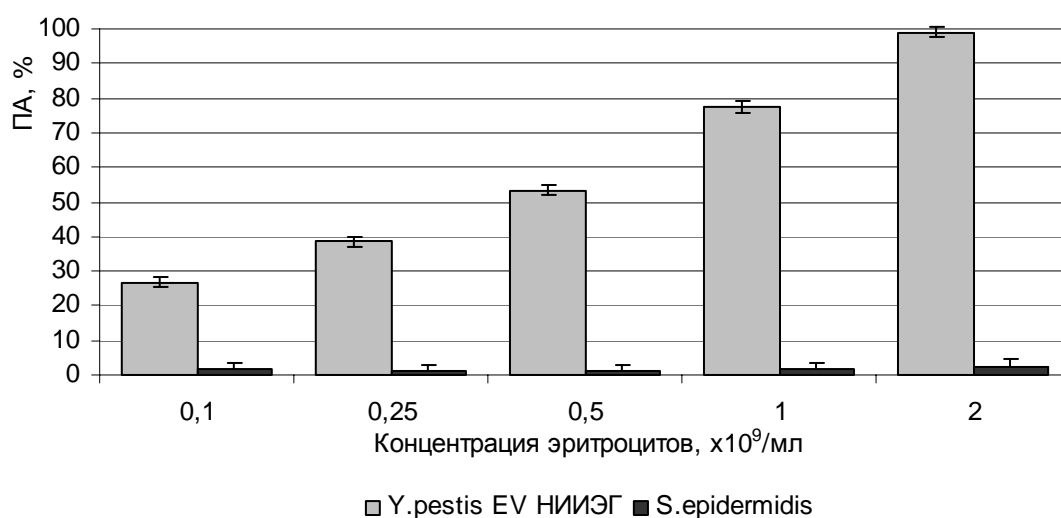


Рисунок 2. Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ и *Staph. epidermidis* к эритроцитам человека в зависимости от концентрации эритроцитов

В дальнейшем при использовании культуры *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также пробиотических, клинических и музейных культур микроорганизмов, нами была показана сопоставимость показателей адгезии, получаемых фотоколориметрическим методом и методом Брилис. Однако применение фотоколориметрии для исследования адгезивных свойств бактерий обладало значительным преимуществом. Предложенный нами метод являлся менее трудоемким, а также давал возможность определять процент микробных клеток, фиксированных к поверхности эритроцитов, одномоментно оценивая взаимодействие миллионов бактерий и клеток макроорганизма. Данные, получаемые с его помощью, отличались объективностью, так как основывались на показаниях прибора.

Следующий этап работы был посвящен выбору оптимальных и стандартных условий для оценки адгезивных свойств бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ фотоколориметрическим методом. При определении влияния

продолжительности инкубации проб на уровень адгезии установили, что ПА достигал максимального значения (около 80%) уже после 5-минутной экспозиции микробных клеток с эритроцитами. Варьирование температурой, а также использование для инкубации проб вращающейся платформы не влияло на интенсивность адгезивного процесса (рис. 3). Это свидетельствовало о достаточно высокой функциональной активности адгезинов чумного микроба, проявляемой в отношении рецепторов эритроцитов человека, и отсутствии влияния на неё температурного фактора в изученном диапазоне. Учитывая полученные результаты, в последующих экспериментах пробы инкубировали в статических условиях при температуре $(20\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 5 мин.

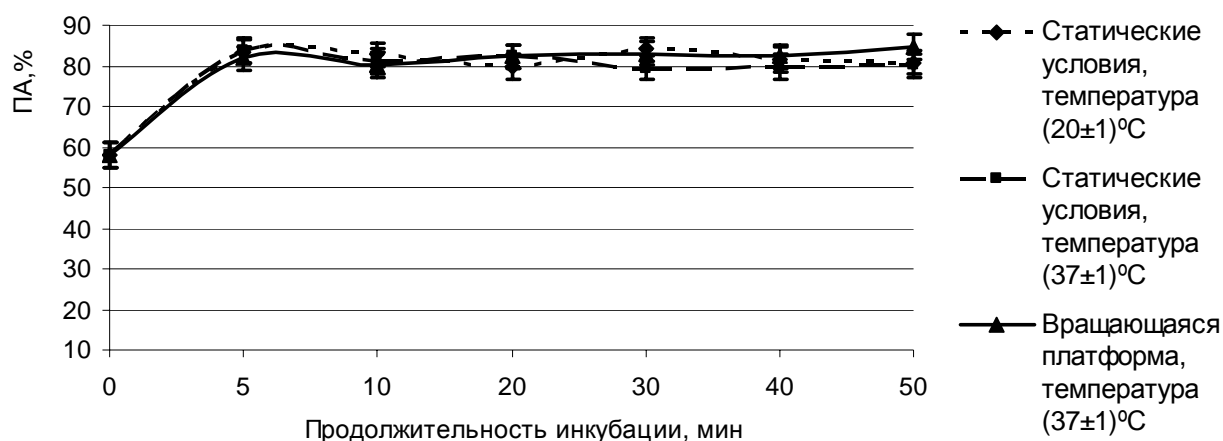


Рисунок 3. Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека при различных условиях инкубации проб

При оценке влияния кислотности инкубационной среды на характер межклеточного взаимодействия выявили, что наибольшую адгезивную активность бактерии *Y. pestis* EV НИИЭГ проявляли при значении pH, близком к нейтральному (рис. 4). Смещение величины pH среды инкубации, как в кислую, так и в щелочную сторону приводило к снижению ПА.

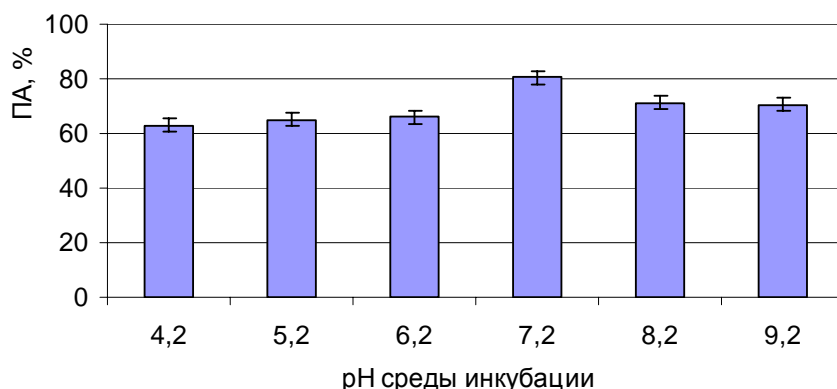


Рисунок 4. Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека в зависимости от величины pH инкубационной среды

Оценка влияния хранения культуры *Y. pestis* EV НИИЭГ на её адгезивные свойства показала, что бактерии, находящиеся в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (pH 7,2) при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ до 21 суток, сохраняли свою способность к адгезии. Вместе с тем при более длительном хранении микробной культуры регистрировали четырехкратное снижение адгезивной

активности штамма. Это связывали с образованием бактериями конгломератов, которые обнаруживались при световой микроскопии. По-видимому, агрегация микробных клеток уменьшала возможность отдельных бактерий прикрепляться к эритроцитам.

При исследовании зависимости уровня адгезии от срока хранения эритроцитов было установлено, что величина ПА бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов, находившихся в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (рН 7,2) при температуре $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ до 5 суток, статистически значимо не отличалась от таковой в отношении свежих эритроцитов. В то же время при инкубации бактерий с эритроцитами, хранившимися более длительный период, в пробах обнаруживался гемолиз, вследствие чего фотоколориметрическая оценка адгезии становилась невозможной. Применение для хранения эритроцитов 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,2), 0,05 М трис-НСl буфера (рН 7,2) и гемоконсервантов – «Глюгисира» и CPDA-1, не имело преимуществ перед 0,9% раствором хлорида натрия (рН 7,2).

Учитывая короткий срок хранения нативных эритроцитов, изучили возможность использования в качестве субстрата адгезии эритроцитов, обработанных формалином и танином. Однако степень адгезии бактерий к формализированным эритроцитам снижалась в 14,7 раза, к танализированным эритроцитам – в 2,1 раза, по сравнению с интактными клетками-мишенями. Исходя из этого, в дальнейших экспериментах обработку эритроцитов формалином и танином не проводили.

Для оценки воспроизводимости данных, получаемых фотоколориметрическим методом, определяли ПА клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ по отношению к свежим эритроцитам одного и того же донора в серии опытов, проводимых с интервалами в 10 дней. Параллельно, пользуясь методом Брилис, определяли величину ИАМ вакцинного штамма (табл. 1).

Таблица 1

Показатели адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека, полученные в опытах с интервалами в 10 дней ($M\pm m$; $n=5$)

Показатели	Значения показателей в опыте № ...						
	1	2	3	4	5	6	7
ПА, %	75,6 \pm 4,5	77,6 \pm 2,3	73,2 \pm 5,3	82,6 \pm 2,6	70,8 \pm 6,7	79,3 \pm 4,1	75,0 \pm 1,6
ИАМ	6,6 \pm 1,4	3,0 \pm 0,5*	8,1 \pm 2,0	3,1 \pm 0,4*	11,8 \pm 1,6*	7,8 \pm 2,4	7,9 \pm 1,8

Примечание: * $P<0,05$ – различия статистически достоверны по сравнению с аналогичным показателем в опыте №1.

Значения ПА в повторных опытах статистически значимо не отличались от ПА в опыте №1. В то же время величина ИАМ в опытах №2 и 4 была достоверно ниже, а в опыте № 5 – достоверно выше, чем в опыте №1. Следовательно, разработанный нами метод позволял, в отличие от методики Брилис, получать воспроизводимые результаты.

Таким образом, нами были отработаны оптимальные и стандартные условия для определения адгезивной активности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ

на модели эритроцитов человека при помощи фотоколориметрии. Характеристика этих условий была следующей: а) применение суспензии бактерий в концентрации, соответствующей 1,0 единице ОП, в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (рН 7,2); б) применение суспензии нативных эритроцитов человека 0(I) Rh+ группы крови в концентрации $1,0 \times 10^9$ /мл в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (рН 7,2); в) инкубация проб в статических условиях при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 5 мин. При проведении исследований допускалось хранение суспензии бактерий при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ до 21 суток, суспензии эритроцитов в аналогичных условиях – до 5 суток. В последующих экспериментах оценку адгезивных свойств штамма проводили, пользуясь разработанным нами методом.

Полученные результаты, свидетельствующие о выраженной способности чумного микроба прикрепляться к эритроцитам, позволяли предположить о присутствии феномена адгезии *Y. pestis* к красным клеткам крови в условиях макроорганизма. Известно, что чумные бактерии способны проникать внутрь эритроцитов как *in vitro*, так и *in vivo*, и использовать Нб в качестве универсального источника железа и порфиринов, необходимых для нормальной жизнедеятельности микробной клетки и синтеза ДНК (Федорова, Девдариани, 2007). На наш взгляд, адгезия может являться начальной стадией подобного межклеточного взаимодействия, предшествующей инвазии.

3. Исследование влияния условий культивирования бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ и физиологического состояния микробной культуры на адгезивные свойства штамма

Ранее было установлено, что продукция чумным микробом факторов адгезии зависит от целого ряда условий выращивания бактерий (Lindler et al., 1990; Liu et al., 2006). Это нашло подтверждение и в наших исследованиях. Проведенные эксперименты показали, что на степень связывания клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека значительное влияние оказывал состав питательной среды для культивирования бактерий (табл. 2).

Таблица 2

Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека в зависимости от состава питательной среды ($M \pm m$; $n=5$)

Дополнительные ингредиенты в составе среды	ПА микробных клеток, выращенных на питательной среде ..., %		
	МПА	ГРМ-агар	АХ
Отсутствуют	$35,2 \pm 2,9$	$53,1 \pm 6,0^*$	$58,8 \pm 4,8^{**}$
Na_2SO_3	$27,7 \pm 3,5$	$68,4 \pm 2,6^{***/*}$	$74,6 \pm 1,8^{***/*}$
ГВ	$32,9 \pm 3,0$	$78,8 \pm 4,2^{***/*}$	$76,8 \pm 3,3^{***/*}$
$\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{ГВ}$	$39,6 \pm 5,3$	$73,5 \pm 2,7^{***/*}$	$75,0 \pm 2,3^{***/*}$

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ – различия статистически достоверны по сравнению с уровнем адгезии бактерий, выращенных на МПА с соответствующими дополнительными ингредиентами; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ –

различия статистически достоверны по сравнению с уровнем адгезии бактерий, выращенных на соответствующей питательной среде без дополнительных ингредиентов.

Показатель адгезии микробных культур, выращенных на ГРМ-агаре и АХ, в 1,51-2,47 раза превышал аналогичный показатель культур, выращенных на МПА. При этом включение в состав МПА сульфита натрия и ГВ не влияло на способность бактерий к адгезии, в то время как их добавление в ГРМ-агар и АХ приводило к повышению адгезивности штамма в 1,26-1,48 раза.

Поскольку при культивировании бактерий на АХ и ГРМ-агаре с ГВ и сульфитом натрия в равной мере наблюдался высокий уровень экспрессии адгезинов, эти среды были использованы нами для дальнейшего изучения способности бактерий к адгезии.

Помимо состава среды выращивания адгезивные свойства штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ зависели от температуры выращивания бактерий и, в некоторой степени, от возраста микробной культуры (рис. 5).

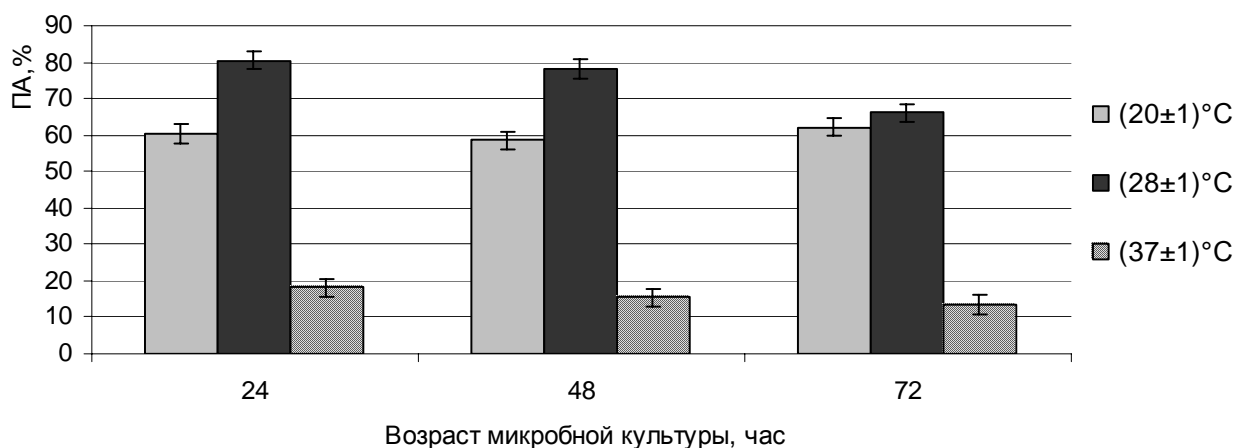


Рисунок 5. Показатель адгезии штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека в зависимости от температуры выращивания бактерий и возраста микробной культуры

В наибольшей степени адгезивный потенциал штамма проявлялся при культивировании бактерий при температуре (28±1)°C. Для 24- и 48-часовой культур микроорганизмов, выращенных в данных условиях, ПА составлял 80,5% и 78,1% соответственно, а у 72-часовой культуры снижался до 66,2%. Для бактерий, выращенных при температуре (18±1)°C, значения ПА варьировали от 58,6% до 62,1%, при температуре (37±1)°C – от 13,5% до 18,1%, при этом возраст микробных культур не оказывал значительного влияния на их адгезивную активность. Потенциальный адгезин чумного микроба (белок PsaA) экспрессируется только в диапазоне температур 35...41°C и кислых условиях среды (Yang, Iseberg, 1997). Полученные нами результаты, показывающие высокую адгезивную активность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при относительно низких температурах и нейтральном pH, позволяли предположить о наличии у чумных бактерий, вероятно, и других факторов адгезии.

Многократное пассирование микробной культуры на среде культивирования не влияло на способность микробных клеток связываться с эритроцитами (рис. 7), что свидетельствовало о сохранении адгезивных свойств у различных генераций чумного микроба при культивировании его в условиях, благоприятных для продукции адгезинов.

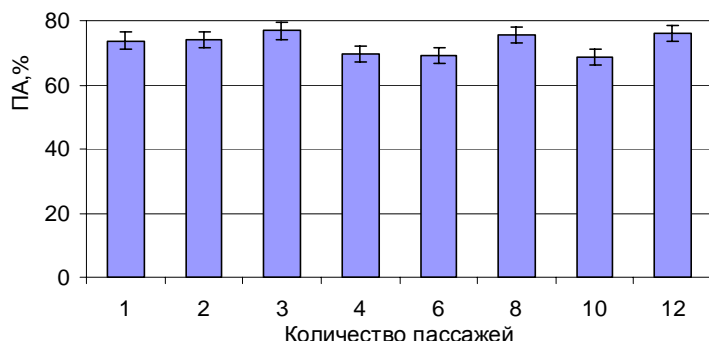


Рисунок 7. Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека после различного количества пассажей микробной культуры на питательной среде

При сравнении уровня адгезии культуры бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенной на питательной среде, и культуры, полученной в результате разведения чумной живой сухой вакцины 0,9% раствором натрия хлорида (рН 7,2), статистически значимых различий не выявили. Следовательно, лиофилизация микробных клеток, осуществляемая в процессе производства вакцины, не приводила к изменению адгезивной активности штамма.

4. Взаимосвязь адгезивной активности и гидрофобности бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ

Для выяснения механизмов, участвующих в адгезии, определяли гидрофобные свойства поверхности бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных в различных условиях. Считается, что уровень гидратации внешней мембраны клеточной стенки имеет немаловажное значение во взаимодействии микроорганизмов с эукариотическими клетками на их начальном этапе, а бактерии с выраженными гидрофобными свойствами способны проявлять высокую адгезивность (Pan et al., 2006; Дмитриева с соавт., 2007). Проведенные исследования показали, что гидрофобность микробных культур коррелировала с уровнем адгезии ($r=0,87$). Это позволило сделать предположение о значимости гидрофобных взаимодействий в процессе прикрепления чумного микроба к эритроцитам.

5. Сравнение адгезивных и гемагглютинирующих свойств бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ

Далее нами было проведено сравнение адгезивной и гемагглютинирующей активности бактерий исследуемого штамма. Известно, что для целого ряда микроорганизмов способность вызывать склеивание эритроцитов имеет прямую связь с адгезивной активностью (Макаренкова с соавт., 1999; Харсеева с соавт., 2009). В связи с этим реакция гемагглютинации (РГА) часто используется как полуколичественный тест для обнаружения у бактерий факторов связывания с эукариотическими клетками. В наших экспериментах гемагглютинирующие свойства бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ

проявлялись независимо от их адгезивности, проявляемой в отношении эритроцитов человека (табл. 3).

Таблица 3

Показатели, характеризующие адгезивные (ПА, %) и гемагглютинирующие (средний титр РГА) свойства культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при различной температуре ($M \pm m$; $n=5$)

Показатели	Температура выращивания микробной культуры ..., °C		
	20±1	28±1	37±1
ПА, %	58,6±1,0	78,1±3,0	15,4±1,9
Средний титр РГА	1:89,6±23,5	1:224,0±85,9	1:243,2±76,8

Таким образом, РГА не позволяла раскрывать адгезивную способность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ. Очевидно, что в этом плане преимуществами обладала предложенная нами модель.

6. Оценка влияния трипсина и высокой температуры на адгезивную способность бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ

По современным представлениям, адгезины являются поверхностными белками или гликопротеидами бактериальной клетки (Klemm, Schembri, 2000; Dubreuil et al., 2002). Идентифицированные к настоящему времени факторы адгезии чумного микроба, опосредующие его прикрепление к эпителиоцитам, также представляют собой белки (Маковейчук et al., 2003; Galvan et al., 2007). С целью установления природы компонентов клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, ответственных за связывание с эритроцитами, проводили обработку микробной культуры трипсином, а также её прогревание при температуре $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$.

При обработке бактерий трипсином в течение 10-30 мин величина ПА снижалась в 2,4-4,5 раза, при прогревании микробной суспензии в течение 1-3 часов – в 1,3-1,9 раза, по сравнению с интактными бактериями (рис. 8). Полученные данные свидетельствовали о белковой природе структур микробных клеток, обеспечивающих реализацию адгезивной функции в отношении эритроцитов.

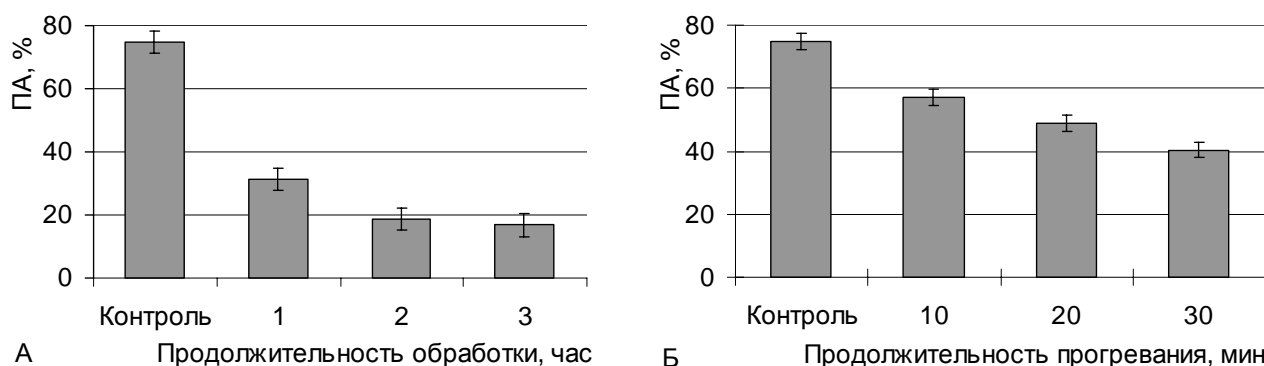


Рисунок 8. Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека после обработки микробных клеток трипсином (А) и прогревания микробной суспензии при температуре $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ (Б)

Тем не менее, после ферментативной и температурной обработки штамм сохранял определенную долю адгезивной активности. Это подтверждало участие в прикреплении чумных бактерий к эритроцитам, помимо белковых субстанций, и других факторов. Таковыми, на наш взгляд, могут являться высокогидрофобные компоненты клеточной стенки *Y. pestis* липидной природы, в частности ЛПС.

7. Адгезивные свойства штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов различных доноров

При проведении исследований значительный интерес представляло определение роли антигенных детерминант эритроцитов человека, обуславливающих его принадлежность к определенной группе крови, в рецепции адгезинов чумных бактерий. В ходе работы нами учитывались две важнейшие системы подобных детерминант – АВ0 и Rh (Воробьев, 2005).

Эксперименты показали, что значения ПА бактерий в отношении эритроцитов людей с различными группами крови по каждой из данных систем статистически значимо друг от друга не отличались (рис. 9). Следовательно, групповые изоантигены А и В, а также Rh-фактор не играли роли во взаимодействии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами.

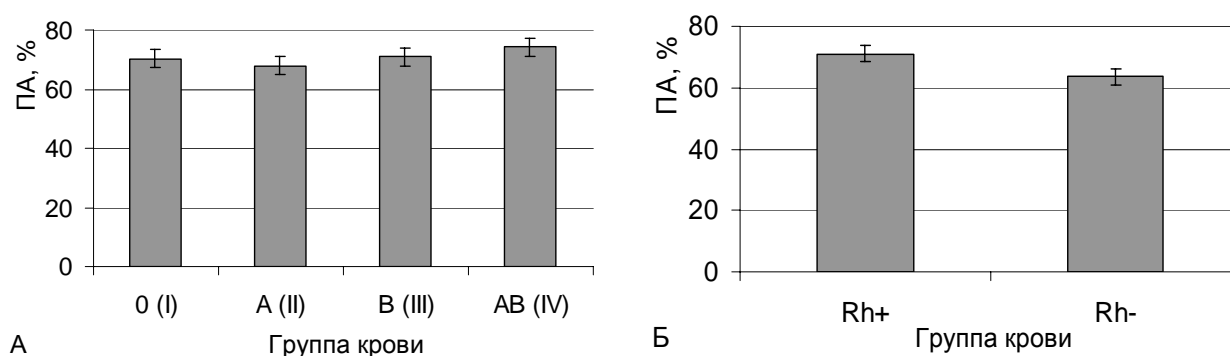


Рисунок 9. Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам доноров с различными группами крови по системе АВ0 (А) и Rh (Б)

Вместе с тем уровень связывания бактерий эритроцитами отдельных доноров значительно варьировал. Минимальная величина ПА в эксперименте составила порядка 35,6%, максимальная – 90,6%. Разброс показателей связывали с влиянием на исход адгезии индивидуальных особенностей рецепторного аппарата эритроцитов, обусловленных различным составом биополимеров плазматической мембраны.

Таким образом, при определении адгезивной способности чумного микроба в качестве субстрата адгезии можно было применять эритроциты людей различных групп крови по системам АВ0 и Rh, но при этом обязательно учитывать влияние на получаемые результаты свойств клеток-мишеней. Для стандартизации экспериментов нами на протяжении каждой последующей серии опытов применялись эритроциты одного и того же донора.

8. Адгезивные свойства штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов различных видов животных

Для адекватной оценки адгезивной активности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов различных видов млекопитающих необходимо было выбрать оптимальный режим экспозиции бактерий с клетками-мишенями. С этой целью была проведена серия экспериментов, в которой варьировали температурой, условиями и продолжительностью инкубации смеси клеток. Эффективным для проявления бактериями адгезивных свойств в отношении эритроцитов животных оказалось инкубирование проб при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на вращающейся платформе в течение 30 мин.

При применении данных условий экспозиции реакционной смеси наибольшие показатели адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ (70-84%) регистрировали в отношении эритроцитов белой мыши, белой крысы и свиньи, средние (43-62%) – в отношении эритроцитов золотистого хомячка, морской свинки, собаки, барана и коровы, наименьшие (в пределах 22-31%) – в отношении эритроцитов кошки и лошади (табл. 4).

Таблица 4

Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам различных видов животных

Вид животного	Количество животных	ПА, % ($M\pm m$)
Белая мышь	12	$70,7\pm 3,6$
Белая крыса	8	$84,0\pm 5,0$
Золотистый хомячок	10	$47,1\pm 4,4$
Морская свинка	12	$61,1\pm 2,8$
Кошка	6	$22,1\pm 5,5$
Собака	6	$57,1\pm 3,9$
Свинья	6	$73,8\pm 3,2$
Лошадь	6	$30,6\pm 1,9$
Баран	5	$43,4\pm 3,7$
Корова	8	$45,3\pm 3,1$

Выявленные нами значительные различия в способности чумного микроба прикрепляться к красным клеткам крови различных видов млекопитающих объясняли видовыми особенностями рецепторных структур эритроцитов, взаимодействующих с адгезинами бактерий.

9. Влияние антибиотиков на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека

По данным литературы (Wu et al., 1995; Шубин с соавт., 2000), многие антибиотики, применяемые в субингибирующих концентрациях, способны снижать прикрепление патогенных микроорганизмов к клеткам и тканям

хозяина. Считается, что подобный эффект в сочетании с антибактериальным действием может усиливать химиотерапевтическую эффективность данных препаратов.

В связи с этим нами была проведена оценка действия ряда антибиотиков на адгезивную активность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов человека. В экспериментах использовали гентамицин, доксициклин, и цефатоксим – препараты, положительно себя зарекомендовавшие при лечении чумной инфекции (Романов с соавт., 2001; Mwengee et al., 2006), а также ампициллин, к которому чумной микроб малочувствителен.

Антибиотики вносили в пробы непосредственно перед смешиванием микроорганизмов с эритроцитами человека, а кроме того применяли варианты опыта с предварительной 30-минутной обработкой при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ антибиотиками бактерий (эритроцитов) и последующей их инкубацией с необработанными эритроцитами (бактериями). Было обнаружено, что при всех модификациях эксперимента тестируемые препараты, используемые в терапевтических и субтерапевтических концентрациях (гентамицин и доксициклин – 3,0 и 6,0 мкг/мл, ампициллин – 10,0 и 20,0 мкг/мл, цефотаксим – 40,0 и 100,0 мкг/мл соответственно) не оказывали влияния на связывание бактерий с эритроцитами.

10. Влияние плазмы, сыворотки крови и их отдельных компонентов на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека

На завершающей стадии исследований определяли влияние на адгезивные свойства штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ нативной плазмы и сыворотки крови человека, а также коммерческих препаратов – альбумина и нормального иммуноглобулина человека.

Приготовление опытных проб проводили по следующей схеме. Суспензию отмытых эритроцитов человека в объеме 1,0 мл центрифугировали при 300 g в течение 5,0 мин. Супернатант в объеме 0,75 мл удаляли, а к осадку добавляли 0,75 мл тестируемого компонента и 2,5 мл суспензии бактерий.

Контрольные пробы готовили, смешивая: 2,5 мл суспензии бактерий и 1,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия (рН 7,2) (контроль №1); 0,25 мл осадка эритроцитов, 0,75 мл исследуемого препарата и 2,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия (рН 7,2) (контроль №2). Уровень адгезии определяли фотокolorиметрически после инкубации проб в статических условиях при температуре $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин.

Анализ экспериментов показал, что все тестируемые препараты оказывали выраженное ингибирующее действие на процесс прикрепления бактерий к эритроцитам при добавлении в пробы непосредственно перед смешиванием микробных клеток с эритроцитами (табл. 5). Наибольшей антиадгезивной активностью обладали плазма и сыворотка крови, которые при использовании в цельном виде снижали величину ПА в 15,9 и 7,8 раза

соответственно. Их ингибиторный эффект проявлялся вплоть до разведения 1:64 и исчезал при разведении 1:128. Альбумин и иммуноглобулин человека, применяемые цельными, снижали ПА в 2,5 и 2,0 раза соответственно. Антиадгезивное действие данных препаратов регистрировали до разведения 1:8. Более выраженную ингибиторную активность цельной плазмы по сравнению с цельной сывороткой мы связывали с антиадгезивными свойствами фибриногена, входящего в её состав. Полученные результаты свидетельствовали о наличии у плазмы (сыворотки) крови собственного защитного антимикробного действия, направленного на снижение прикрепления чумных бактерий к эритроцитам, и вовлечении целого ряда её компонентов в процесс взаимоотношений патогена с организмом хозяина.

Таблица 5

Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека в присутствии препаратов плазмы и сыворотки крови ($M \pm m$; $n=5$)

Тестируемый препарат	ПА микробных клеток при использовании препарата в разведении ..., %								Контроль
	цельн.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
Сыворотка крови человека	10,0 ± 1,4***	12,8 ± 2,4***	23,1 ± 2,7***	33,9 ± 3,9***	43,2 ± 4,7***	53,8 ± 4,6**	66,0 ± 2,1**	76,4 ± 3,0	77,6 ± 2,1
Плазма крови человека	4,9 ± 1,3***	18,0 ± 2,3***	20,9 ± 3,6***	35,1 ± 2,8***	43,7 ± 2,7***	58,9 ± 3,1**	65,3 ± 3,4*	72,2 ± 4,8	
Альбумин человеческий	31,0 ± 2,2***	48,3 ± 3,7***	53,5 ± 1,8***	67,8 ± 2,9*	77,1 ± 2,9	77,6 ± 2,1	71,3 ± 3,5	76,8 ± 4,6	
Иммуноглобулин нормальный	39,7 ± 2,3***	52,6 ± 3,8***	55,5 ± 3,4***	69,4 ± 2,1*	76,4 ± 3,0	74,6 ± 2,3	81,5 ± 2,6	72,2 ± 5,4	

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ различия статистически достоверны по сравнению с контролем.

В следующей серии экспериментов нами было установлено, что предварительная 30-минутная обработка при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ сывороткой крови, альбумином и иммуноглобулином, как бактерий, так и эритроцитов перед их соединением с необработанными клетками обеспечивала более значительное снижение ПА по сравнению с добавлением соответствующих компонентов в пробы непосредственно перед смешиванием микробов с эритроцитами (рис. 11). Следовательно, подавление адгезивной способности бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ тестируемыми препаратами могло объясняться блокированием как адгезинов микроорганизмов, так и рецепторов клеточных мишеней.

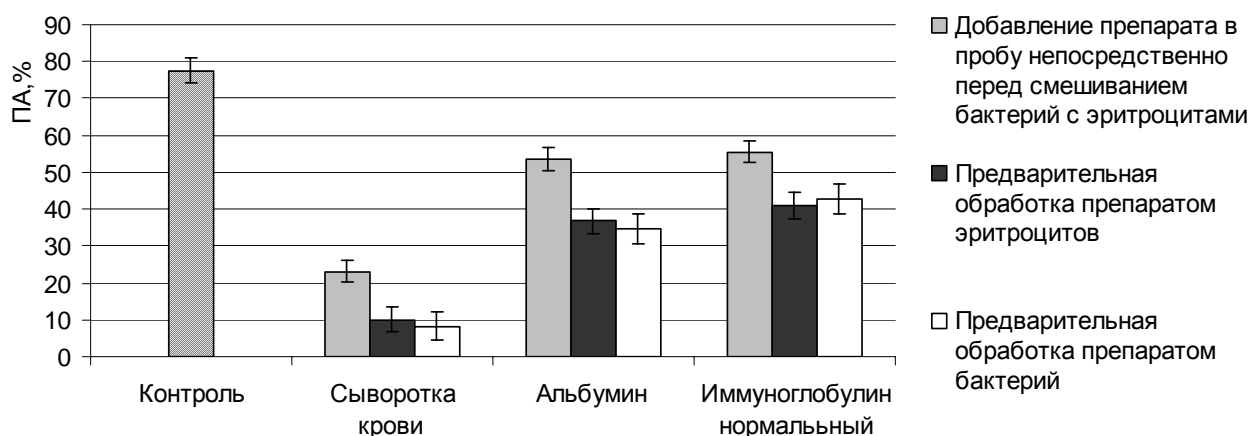


Рисунок 11. Показатель адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека при различных вариантах внесения сыворотки крови человека и её отдельных белковых фракций (разведение 1:4) в систему «микробные клетки-эритроциты»

Таким образом, разработанный нами метод оценки адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ на модели эритроцитов оказался эффективным инструментом для изыскания препаратов, препятствующих проявлению чумными бактериями адгезивных свойств, и изучения механизма их действия, что позволяло значительно расширить область его применения.

ВЫВОДЫ

1. Традиционные методы оценки адгезии микроорганизмов к эритроцитам либо не позволяют выявлять адгезивные свойства клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ (метод С.С. Гизатулиной), либо обладают существенными недостатками (метод В.И. Брилис).

2. Разработан метод определения адгезивной активности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ на модели эритроцитов, основанный на фотоколориметрической регистрации связывания микробных клеток с эритроцитами, характеризующийся объективностью и информативностью, а также стандартностью и точностью получаемых данных.

3. Адгезивные свойства штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов человека в значительной степени зависят от состава питательной среды и температуры выращивания бактерий и, в меньшей степени, от возраста культуры, но вместе с тем остаются стабильными при лиофильном высушивании микробных клеток и их пассажах на питательной среде.

4. Степень связывания бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека не зависит от группы крови донора по системам АВ0 и Rh, но в то же время зависит от индивидуальных особенностей эритроцитов.

5. Уровень адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам разных видов млекопитающих имеет существенные различия. Наибольшую адгезивную активность бактерии данного штамма проявляют в отношении эритроцитов белой мыши, белой крысы, свиньи, среднюю – в отношении

эритроцитов морской свинки, золотистого хомячка, собаки, барана, коровы, наименьшую – в отношении эритроцитов кошки и лошади.

6. Гентамицин, доксициклин, цефотаксим и ампициллин, применяемые в терапевтических и субтерапевтических концентрациях, не влияют на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека.

7. Нативная сыворотка и плазма крови, а также альбумин и нормальный иммуноглобулин обладают выраженным ингибирующим действием на процесс прикрепления клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека. Показано, что механизм действия данных препаратов связан с блокированием как адгезинов бактерий, так и рецепторных структур эритроцитов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Ивонин, А.Г.** Разработка и перспективы применения фотометрического метода определения бактериофиксирующей активности эритроцитов (БФАЭ) в ветеринарии / А.Г. Ивонин, В.А. Оборин // Известия ОГАУ. – 2008. – № 3. – С. 80–82.

2. Оборин, В.А. Изучение адгезии клеток вакцинного штамма EV *Yersinia pestis* к эритроцитам человека фотоколориметрическим методом / В.А. Оборин, **А.Г. Ивонин**, Е.В. Пименов, В.Е. Романов, Ф.И. Абашева, О.В. Вылегжанина // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2009. – Т. 7. – Вып. 3. – С. 25–29.

3. Костяев, А.А. Влияние различных условий и сроков хранения эритроцитов на показатель их бактериофиксирующей активности / А.А. Костяев, **А.Г. Ивонин**, В.А. Оборин // Гематология и трансфузиология. – 2009. – № 6. – С. 45–47.

4. Оборин, В.А. Изучение адгезии бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных фотоколориметрическим методом / В.А. Оборин, Е.В. Пименов, А.Г. Ивонин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 103. – №1. – С. 48–50.

5. Романов, В.Е. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов / В.Е. Романов, **А.Г. Ивонин**, А.Л. Бондаренко, В.А. Оборин, Е.Л. Нехорошкина // Патент РФ на изобретение № 2360969; опубл. 10.07.2009. – Бюл. №11.

6. Оборин, В.А. Фотометрический метод определения бактериофиксирующей активности эритроцитов в отношении возбудителей бактериальных инфекций / В.А. Оборин, А.Л. Бондаренко, В.Е. Романов, **А.Г. Ивонин**, Е.Л. Нехорошкина // Научно практическая конференция и школа по инфекционной патологии (с международным участием). Сборник научных трудов. – М.: МДВ, 2007. – С. 76.

7. **Ивонин, А.Г.** Методы изучения адгезивных свойств микроорганизмов / А.Г. Ивонин, В.А. Оборин // Науке нового века – знания молодых. Сборник статей 8-й научной конференции аспирантов и соискателей. – Киров: Вятская ГСХА, 2008. – С. 12–14.

8. **Ивонин, А.Г.** Фотометрический метод определения бактериофиксирующей активности эритроцитов / А.Г. Ивонин, В.Е. Романов, В.А. Оборин, Е.Л. Нехорошкина // Достижения ветеринарной науки и практики: Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции. Киров: Вятская ГСХА, 2008. – С. 63–69.

9. Оборин, В.А. Изучение взаимодействия эритроцитов крови людей, имеющих различную групповую принадлежность, в отношении вакцинного штамма EV чумного микроба / В.А. Оборин, И.В. Предеина, **А.Г. Ивонин**, Е.Л. Нехорошкина // Актуальные проблемы физической культуры и спорта и пути их решения. Сборник научно-методических статей. Киров: Изд-во ВятГГУ, 2008. – С. 59–62.

10. Оборин, В.А. Перспективы применения антиадгезивной терапии при инфекционных заболеваниях, обусловленных возбудителями чумы, сибирской язвы и сальмонеллеза / В.А. Оборин, Е.В. Пименов, **А.Г. Ивонин**, В.Е. Романов // Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология: Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». – Киров: ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», 2008. – С. 99–103.

11. Оборин, В.А. Изучение адгезивных свойств вакцинного штамма EV чумного микроба с помощью различных методов / В.А. Оборин, Е.В. Пименов, **А.Г. Ивонин** // Там же. – С. 198–202.

12. Оборин, В.А. Исследование бактериофиксирующей активности эритроцитов (БФАЭ) крови различных видов животных и человека в отношении вакцинного штамма EV чумного микроба / В.А. Оборин, Е.В. Пименов, **А.Г. Ивонин**, В.Е. Романов // Там же. – С. 202–205.

13. Оборин, В.А. Роль эритроцитов в генерализации инфекционного процесса при бактериальных инфекциях / В.А. Оборин, Е.В. Пименов, **А.Г. Ивонин**, В.Е. Романов // Там же. – С. 205–209.

14. Оборин, В.А. Изучение механизмов взаимодействия микробов с эритроцитами / В.А. Оборин, Е.В. Пименов, **А.Г. Ивонин**, О.В. Вылегжанина // Актуальные проблемы биологической защиты войск и населения. Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Эпидемиология и эпизоотология. Микробиология. Биотехнология. Экология: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2009. – С. 62–64.

15. Оборин, В.А. К вопросу о роли эритроцитов в инфекционной патологии / В.А. Оборин, Е.В. Пименов, **А.Г. Ивонин**, В.Е. Романов, О.В. Вылегжанина // Там же. – С. 64–66.

16. Vylegzhanina, O.V. Research into mechanisms of bacteria interaction with erythrocytes / O.V. Vylegzhanina, **A.G. Ivonin** // Scientific and practical conference of post-graduates, candidacy applicants, graduates, undergraduates in modern languages «Ex professo». Transactions. – Kirov: Vyatka State University, 2009. – P. 39–40.

Подписано в печать 23.03.2010 г.

Формат 60×84 ¹/₁₆.

Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 1,5.

Тираж 100 экз.

Заказ № 1032.

Издательство Вятского государственного гуманитарного университета,
610002, г. Киров, ул. Красноармейская, 26

Издательский центр Вятского государственного гуманитарного университета,
610002, г. Киров, ул. Ленина, 111, т. (8332) 673-674